

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

FACULTÉ DE MÉDECINE

N° 42

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES BACILLES A GRAM NÉGATIF des urines

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine de Montpellier

LE JUILLET 1950

PAR

ANDRÉ TERDJMAN

né à Sidi-Bel-Abbès, le 9 octobre 1922

Certificat d'Etudes spéciales de Microbiologie

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Examineurs
de la Thèse

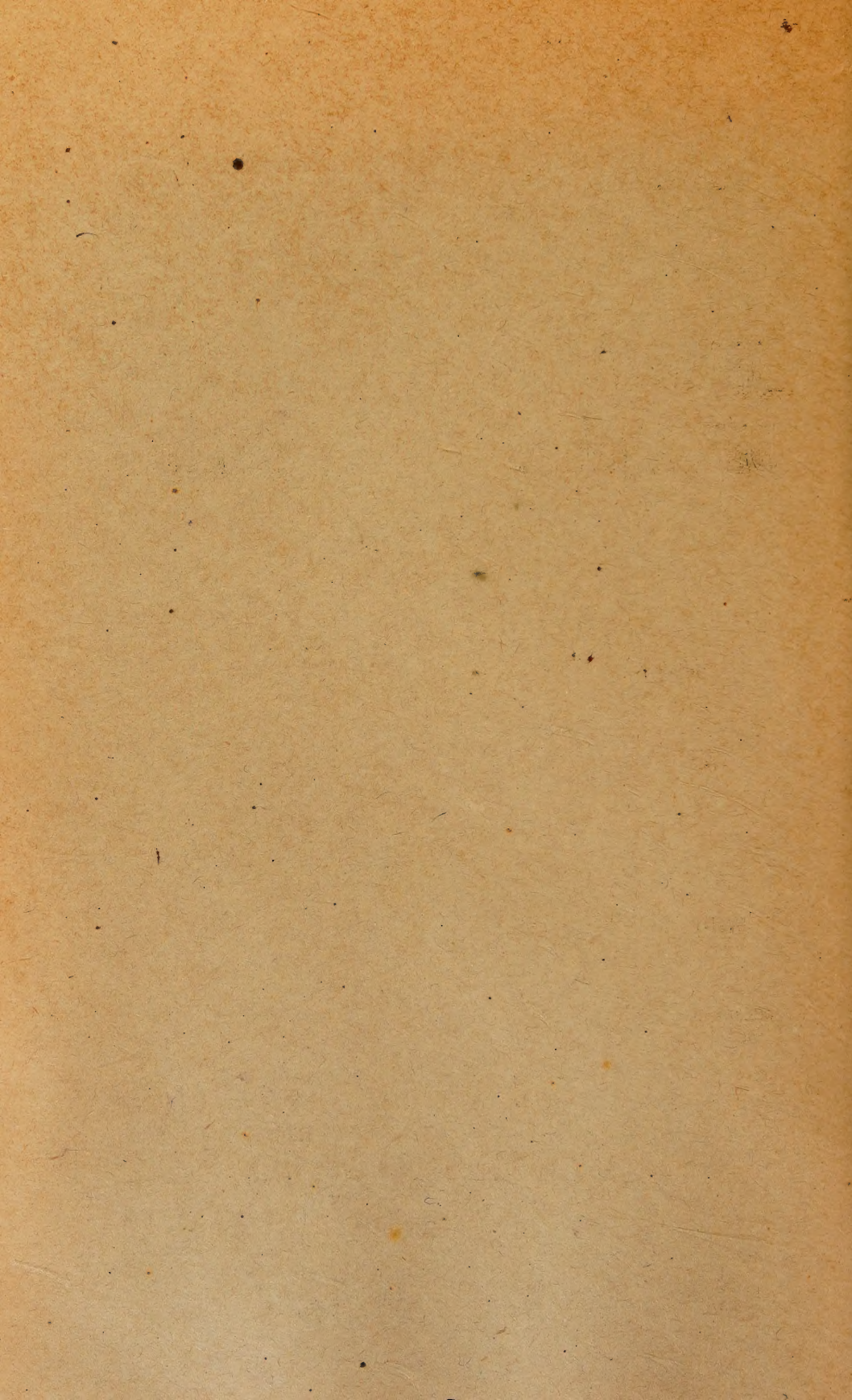
MM. CARRÈRE, professeur, *Président*.
TRUC, professeur.
LAPEYRIE, agrégé.
RENÔUX, agrégé.

Assesseurs

MONTPELLIER

IMPRIMERIE CHARLES DEHAN

1950



PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Professeurs

Chaires :

Anatomie	MM. J. DELMAS.
Histologie	TURCHINI, <i>assesseur</i> .
Physiologie	HEDON.
Chimie biologique et toxicologie.....	CRISTOL.
Physique médicale.....	PECH.
Anatomie pathologique et médecine expérimentale..	BAUMEL.
Microbiologie	CARRERE.
Histoire naturelle médicale et parasitologie.....	HARANT.
Pathologie et thérapeutique générales.....	PAGES.
Thérapeutique et clinique de maladies infect.....	JANBON.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.....	BERT.
Hygiène	CARRIEU.
Médecine légale et médecine sociale.....	VIDAL.
Technique opératoire et chirurgie expérimentale...	ROUX.
Pathologie et clinique propédeutique chirurgicales...	MOURGUE-MOLINES.
Pathologie et clinique propédeutique médicales.....	PUECH.
Clinique médicale	GIRAUD, <i>doyen</i> .
—	BOULET.
Clinique chirurgicale.....	N.
—	LAPEYRE.
Clinique obstétricale.....	CADERAS DE KERLEAU.
Clinique des maladies mentales et nerveuses.....	EUZIERE, <i>doyen hon.</i>
Clinique des maladies des enf. et hyg. du 1 ^{er} âge.....	CHAPTAL.
Clinique de dermato-syphiligraphie.....	MARGAROT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.....	ETIENNE.
Clinique des maladies des voies urinaires.....	TRUC.
Clinique gynécologique.....	AIMES.
Clinique ophtalmologique.....	DEJEAN.
Clinique d'oto-rhino-lar. et chir. maxillo-faciale.....	TERRACOL.
Electro-radiologie.....	LAMARQUE.

Chargés de cours (Prof^r sans chaire) :

Anatomie	LAUX.
Histologie	GRANEL.
Propédeutique médicale.....	P. RIMBAUD.

Professeurs honoraires

MM. BERTIN-SANS, GALAVIELLE, VIRES, VILLARD,
GRYNFELT, RICHE, JEANBRAU, L. RIMBAUD, BOUDET

Chargés d'enseignements complémentaires

MM.		MM.
Chimie.....	BENEZECH.	Neuro-chirurgie..... GROS, <i>agrégé</i> .
Physiologie.....	LOUBATIERES, <i>agr.</i>	Clin. de la tuberc..... VIDAL, <i>professeur</i> .
Anatomie pathol.....	CAZAL, <i>agrégé</i> .	Clin. gast-ent..... BAUMEL, <i>prof</i> .
Pharmacologie.....	HARANT, <i>prof</i> .	Pathologie chir..... LAPEYRIE, <i>agrégé</i> .
Pharmacol. et thé.....	SERRE, <i>agrégé</i> .	— — JOYEUX, <i>agrégé</i> .
Médecine expérim...	PASSOUANT.	— — NEGRE, <i>agrégé</i> .
Pathologie médicale.	BOUCOMONT, <i>agr.</i>	Obstétrique..... COLL DE CARRERA,
— — —	SERRE, <i>agrégé</i> .	<i>agrégé libre</i> .
Path. neurologique.	LAFON, <i>agrégé</i> .	Stomatologie..... HOUPERT, <i>agrégé</i> .
— respiratoire...	BALMES, <i>agrégé</i> .	

Agrégés en exercice

MM.		MM.
Physiologie.....	LOUBATIERES.	Médecine..... PASSOUANT,
Chimie.....	BENEZECH.	Neuro-psychiatrie... LAFON.
Microbiologie	RENOUX.	Chirurgie..... LAPEYRIE.
Médecine.....	BOUCOMONT.	— JOYEUX.
—	SERRE.	— NEGRE.
—	BALMES.	Neuro-chirurgie..... GROS.
—	CAZAL.	Odonto-Stomatol... HOUPERT.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A. T.

A MA MÈRE

A MA FEMME, A MON FILS

A MON ONCLE ET A MA TANTE

A MES GRANDS PARENTS

A MES FRÈRES ET SŒUR

A TOUS LES MIENS



A. T.

A NOTRE JURY DE THÈSE

A Monsieur le Professeur L. CARRÈRE

Professeur de Microbiologie
à la Faculté de Médecine de Montpellier

Qui nous a reçu avec bienveillance dans son service et nous a fait le très grand honneur de présider cette thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A. T.

A Monsieur le Professeur E. TRUC

Professeur à la Faculté de Médecine

Nous le remercions de nous avoir
permis de rassembler les observations
dans son service.

A Monsieur le Professeur agrégé LAPEYRIE

Nous lui exprimons notre recon-
naissance pour son enseignement.

A Monsieur le Professeur agrégé G. RENOUX

Qui nous a proposé le sujet de
cette thèse, qui nous a guidé et pro-
digué ses conseils tout au long de
l'élaboration de ce travail. Nos remer-
ciements très sincères.

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTÉ

A. T.

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES BACILLES A GRAM NÉGATIF DES URINES

Alors que les urologistes discutent longuement du moindre détail d'un examen radiologique ou d'une analyse chimique, ils sont beaucoup moins exigeants dès qu'il s'agit de bactériologie.

Certes, ils ne négligent jamais de compléter leur exploration de l'arbre urinaire par une demande d'examen bactériologique des urines. Mais il est surprenant de constater que la nature exacte de l'agent infectant — bacille de Koch excepté — les préoccupe assez peu. Seul le colibacille les intéresse.

Le plus souvent, d'ailleurs, à la vue d'une urine purulente, leur opinion est faite avant la réponse du laboratoire : « c'est du colibacille », disent-ils.

En vérité, s'il est fréquent de trouver des colibacilles dans les pyuries, il ne faudrait pas en conclure que tous les bacilles à Gram négatif des urines pathologiques sont des colibacilles.

Une méthode rigoureuse montre la grande diversité des microbes en cause dans les infections de l'arbre urinaire.

Nous avons étudié au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine (Service de M. le professeur L. CARRÈRE), 125 souches de bacilles à Gram négatif.

Le but de ce travail est :

- de donner une méthode d'isolement et d'identification rapide et pratique des bacilles à Gram négatif aérobies des urines pathologiques ;
- de montrer la diversité de la flore microbienne en cause ;
- de chercher s'il y a quelque rapport entre le germe en cause et la forme ou la gravité de l'affection.

Cette étude présente un double intérêt :

1° Clinique et Thérapeutique :

Car la connaissance exacte du germe en cause est toujours souhaitable, depuis que l'on dispose d'une gamme d'antibiotiques et d'agents thérapeutiques spécifiques de certains germes. Et, d'autre part, l'intérêt que peut présenter l'identification exacte est encore plus grand si nous arrivons à montrer qu'il peut y avoir corrélation entre l'agent infectant et la forme ou la gravité de l'infection.

2° Pratique :

L'examen bactériologique des urines est un travail qui est fait en grande série dans les laboratoires hospitaliers et privés. Il importe donc de disposer d'une méthode permettant une identification rapide et donnant le maximum de certitude avec le minimum de manipulations.

Voici, rapidement indiquée, la manière dont nous avons procédé :

- nous avons utilisé des urines prélevées aseptiquement, provenant de malades du Service d'urologie de M. le professeur TRUC ;
- nous avons fait d'abord un examen direct, une coloration au bleu de méthylène et une coloration par la méthode de Gram.

Nous n'avons retenu pour cette étude que les bacilles Gram négatifs aérobies asporulés, provenant d'urines contenant également du pus.

- Nous avons alorsensemencé sur milieux différentiels, soit l'urine si les germes y étaient nombreux, soit le culot de centrifugation.
-

TECHNIQUES D'IDENTIFICATION

Il nous a paru utile de donner ici les différentes techniques que nous avons utilisé, car il semble que des divergences considérables de résultats soient dues le plus souvent à un défaut d'unification des méthodes, les résultats pouvant varier beaucoup selon la technique choisie.

I. — L'attaque du glucose et du lactose.

Celle-ci a été étudiée sur le milieu de Hajna, qui présente le gros avantage de montrer à la fois la fermentation du glucose, du lactose, le dégagement de gaz et la formation de SH^2 . Nous utilisons le milieu de Hajna modifié par ROLAND, dont la formule est :

Peptone.	20 grammes
Gélose.	13 grammes
Chlorure de sodium. . . .	5 grammes
Eau.	1000 ml.
amener à pH 7,5.	
Lactose.	10 grammes
Glucose.	1 gramme
Hyposulfite de soude. . . .	0,2 gr.
Sulfate de fer ammoniacal. .	0,2 gr.
amener à pH 7,4.	
Rouge de phénol en solution	
aqueuse à 1 %.	2,5 ml.

On répartit en tubes, on stérilise 15 minutes à 110°. On incline en laissant un culot de 3 centimètres de hauteur.

L'attaque du lactose se fait en aérobiose et se traduit par le virage de la pente qui devient jaune tandis que l'attaque du glucose se fait en anaérobiose et le culot vire au jaune.

Certains germes attaquent le lactose très lentement, c'est pourquoi nous avons conservé pendant huit jours à l'étuve les tubes lactose négatif, avant d'enregistrer le résultat définitif.

II. — La formation d'indol.

Nous avons utilisé la réaction de Salkowski classique sur eau peptonée fabriquée avec une peptone exempte d'indol (peptone Difco). On ajoute à 5 ml. de milieu six gouttes de nitrate de soude et douze gouttes d'acide sulfurique. Il arrive fréquemment que la réaction soit négative au bout de vingt-quatre heures et positive au bout de quarante-huit heures. La formation d'indol se traduit par une couleur rouge éclatant ; les colorations rosées ne sont pas dues à l'indol, mais à la formation d'acétylméthylcarbinol.

III. — Uréase.

Nous utilisons, pour rechercher l'uréase, le milieu de Ferguson, facile à préparer, d'emploi extrêmement pratique et se conservant un mois à la glacière :

Urée.	2 grammes
Phosphate monopotassique .	0 gr. 1
Phosphate bipotassique. . .	0 gr. 1

Chlorure de sodium. 0 gr. 5

Alcool à 90°. 1 ml.

Eau distillée. 100 ml.

Rouge de phénol à 0,2 pour 100, quantité suffisante pour obtenir une coloration jaune nette.

Le milieu ne doit pas être stérilisé, il se conserve à la glacière en flacon. Pour l'emploi, mettre dans un tube à hémolyse dix gouttes du milieu dans lequel on ensemence trois anses de la culture sur gélose. On met à l'étuve et on examine dans les trois heures : s'il y a une uréase, le milieu vire au violet, la réaction pouvant apparaître dans des délais très variables, de une heure à seize heures.

IV. — Test au rouge de méthyle.

Nous avons utilisé le milieu de Clark et Lubs :

Peptone. 5 grammes

Phosphate bipotassique. 5 grammes

Glucose. 5 grammes

Eau, qs. p. 1000 ml.

pH 7,2.

On ensemence largement, soit trois anses de platine de 2 mm. de diamètre pour 5 ml. du milieu, et on met quarante-huit heures à l'étuve. On ajoute alors à 5 ml. du milieu quatre gouttes d'une solution alcoolique de rouge de méthyle à 2 pour 100. Le R. M., qui est jaune au pH 6,2, vire au rouge à pH 4,2 ; il indique ainsi que le germe a attaqué le glucose en développant dans le milieu une acidité plus ou moins importante.

VAUGHAN, MITCHELL et LEVINE préconisent cinq jours d'étuve à 30°, faute de quoi — selon eux — les résultats ne seraient pas valables. Nous avons fait chaque test en double : l'un à 37° avec lecture après quarante-huit heures, l'autre à 30° avec lecture après cinq jours ; dans tous les cas, les résultats se sont montrés concordants.

V. — Réaction de Voges-Proskauer.

Elle consiste à mettre en évidence la formation d'acétylméthylcarbinol à partir du glucose et donne toujours de précieux renseignements pour la classification exacte d'un bacille coliforme.

Si les résultats en sont très discordants selon les auteurs, c'est que les techniques proposées pour la réaliser sont multiples et de valeurs très inégales.

Nous nous sommes ralliés en définitive à la technique de O'Meara, qui nous semble la plus fidèle.

On utilisera le milieu O'Meara préparé de la manière suivante :

Chlorure de sodium. . .	5 grammes
Phosphate bipotassique. .	1 gramme
Phosphate biammoniacal .	1 gramme
Sulfate de magnésic. . .	0 gr. 2
Acide fumarique.	7 grammes
Glucose.	5 grammes
Citrate de soude.	2 gr. 77
Eau, qs. p.	1000 ml.

pH 7,5.

Stériliser vingt minutes à 110°.

Répartir stérilement en Erlenmeyer à raison de 5 ml. de milieu par flacon.

Ensemencer à partir d'une gélose de vingt-quatre heures ; après quarante-huit heures à l'étuve on ajoute 0 gr. 20 de créatine (en pratique, une petite pincée) et 5 ml. de soude à 40 pour 100. On agite vigoureusement et on porte cinq minutes à l'étuve. Si la réaction est positive, il se développe alors une coloration rose éosine, qui est de plus en plus intense et qui est maxima au bout de quinze minutes.

Il est absolument indispensable de répartir le milieu en Erlenmeyer de façon à ce que l'attaque du glucose

se fasse en présence d'oxygène abondant, ce qui met la réaction dans les conditions optima pour obtenir l'acétylméthylcarbinol.

VI. — Utilisation des citrates.

Seuls certains germes peuvent assurer leur croissance en utilisant le citrate comme seule source de carbone organique. Partant de ce principe, KOSER a proposé un milieu à base de citrate de soude ; ce milieu a été modifié par SIMMONS, par adjonction de gélose et d'un indicateur coloré.

Gélose.	20 grammes
Chlorure de sodium.	5 grammes
Sulfate de magnésium.	0 gr. 20
Phosphate mono-ammoniacal.	1 gramme
Phosphate bipotassique.	1 gramme
Citrate de soude.	2 grammes
Eau distillée.	1000 ml.
Bleu de bromothymol en solution alcoolique à 1,5 %.	10 ml.

Les germes qui utilisent le citrate poussent abondamment et le milieu vire dans les vingt-quatre heures avec une belle couleur bleue.

VII. — Culture sur milieu Eosine-Bleu de méthylène.

Ce milieu a été mis au point en 1921, par LÉVINE, et sa composition, ainsi que son mode d'utilisation, sont codifiés par l'American Public Health Association (Standard Methods for the examination of water and Sewage). En France, il semble beaucoup moins utilisé. Signalons cependant que l'Institut Bouisson-Bertrand l'utilise

depuis longtemps pour l'examen bactériologique des eaux d'alimentation.

C'est un milieu lactosé avec un indicateur de potentiel d'oxydo-réduction constitué par un mélange de bleu de méthylène et d'éosine dans des proportions strictement définies.

Il est préparé sous forme déshydratée par DIFCO aux U. S. A., mais il est facile de le préparer soi-même de la manière suivante :

Peptone DIFCO.	10 grammes
Phosphate bipotassique. . .	2 grammes
Gélose.	15 grammes
Eau distillée qsp.	1000 ml.

Dissoudre la peptone et le phosphate bipotassique en chauffant doucement, amener à pH 7,2. Filtrer, ajouter la gélose et dissoudre à chaud. Stériliser vingt minutes à 120°. Au sortir de l'autoclave, ajouter aseptiquement 50 ml. de solution de lactose à 10 pour 100, stérile. Ajouter ensuite 9 ml. de solution d'Eosine Yellowish (National Aniline) à 3 pour 100 et 12 ml. de solution de bleu de méthylène (R. A. L.) à 0,5 p. 100 fraîchement préparée. Agiter soigneusement, répartir en boîtes de Pétri. Le milieu se conserve un mois à la glacière. Il doit avoir une couleur bleu violacé. Nous insistons sur la nécessité absolue d'utiliser l'éosine Y. (National Aniline), faute de quoi les colonies n'ont plus l'aspect classique. De même la préparation du bleu de méthylène exige des conditions précises : nous avons utilisé le bleu de méthylène RAL, la solution est mise à mûrir à l'étuve vingt-quatre heures, puis filtrée et utilisée immédiatement. Le milieu doit être coulé en boîtes de Pétri.

Les germes donnent sur ce milieu des colonies d'aspect caractéristique :

Escherichia Coli :

donne des colonies plates, bien isolées si l'ensemencement a été correctement fait, ayant 2 à 3 millimètres de diamètre. Vues par transparence, elles ont une cou-



FIG. 1 : Colonies d'*E. Coli* sur milieu EMB

leur bleu foncé, presque noir ; par réflexion, elles ont un aspect métallique caractéristique (dos de scarabée). Le milieu lui-même prend un reflet métallique.

D'après Walter Lowie, les *Coli* hémolytiques donnent sur EMB des colonies plus petites, en formes de

gouttelettes, tandis que les *E. coli* non hémolytiques donnent des colonies très plates et d'un diamètre légèrement supérieur.

Aérobacter :

colonies plus grosses de 4 à 5 millimètres de diamètre, souvent confluentes, bombées, luisantes, d'aspect

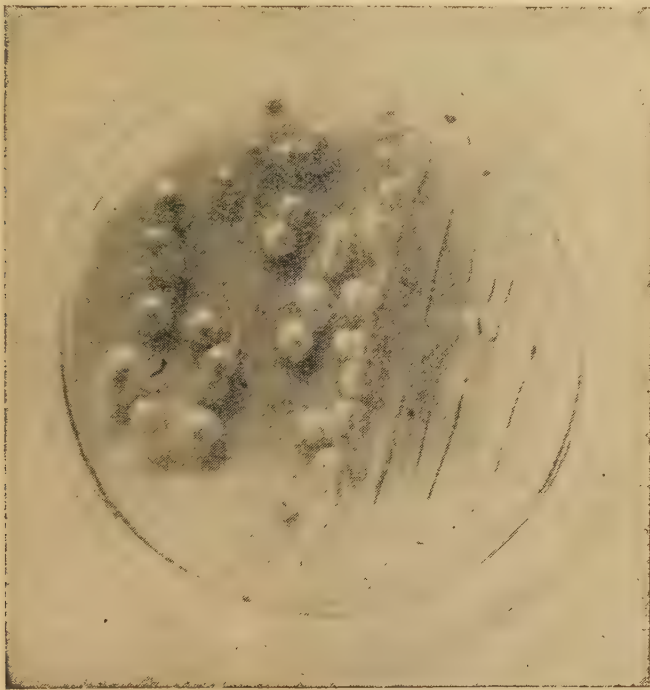


Fig. 2 : Colonies d'*Aérobacter* sur milieu EMB

mucoïde. Elles sont rosées, plus claires que les colonies d'*E. coli*. Vues par transparence, elles présentent un centre brun de 1 millimètre de diamètre environ et une collerette rosée claire. Vues par réflexion, elles ont un aspect humide et n'ont pas de reflet métalli-

que. Il arrive assez souvent qu'on distingue sur la colonie des cercles concentriques bleus qui lui donnent leur aspect en œil de poisson.

Au bout de soixante-douze heures, le centre de la colonie s'effondre fréquemment et prend un aspect métallique. Mais, même dans ce cas, l'aspect reste différent de celui d'E. coli, car ce centre métallique n'occupe qu'une faible partie de la colonie, juste au centre, et le milieu lui-même ne prend jamais de reflet métallique.

Proteus :

colonies très petites, 1 à 2 mm. de diamètre, mauve très pâle, souvent bien isolées. N'ont pas tendance à envahir le milieu en film.

Paracoli :

colonies plates, transparentes ou bleutées, ayant la forme et la dimension des colonies d'E. coli, mais n'ont jamais l'éclat métallique.

Pyocyanique :

colonies plates, bleues, de 5 à 6 mm. de diamètre, non métalliques. Le milieu lui-même change de couleur autour des colonies et prend une teinte verdâtre en vingt-quatre heures. La culture est très aromatique, donne une odeur de miel fort agréable.

Si l'on fait un ensemencement abondant de façon à avoir une nappe continue, il apparaît fréquemment (trois fois sur six souches) des plages arrondies, semblables à des plages de lyse bactériophagique : ce sont les « *plage-like areas* » de TOPLEY et WILSON.

Salmonelles :

donnent des colonies transparentes de 2 mm. de diamètre.

Les cocci poussent mal sur ce milieu ; l'entérocoque, qui est fréquent dans les urines, donne de très petites colonies noires minuscules.

On voit donc que les colonies des différents bacilles sont faciles à distinguer sur ce milieu, chacune ayant un aspect caractéristique.

Cet aspect est constant si l'on a soin d'utiliser un milieu de composition strictement conforme à la formule donnée et avec des colorants préparés dans les conditions voulues.

On arrive, avec un peu d'habitude, à reconnaître les colonies d'emblée, avec des chances d'erreur réduites au minimum.

Marche à suivre pour l'identification

La marche à suivre que nous proposons pour une identification complète est la suivante :

HEURES	MANIPULATIONS	LECTURE DES TESTS
0 heure.....	1° S'assurer qu'il y a dans l'urine des bacilles à Gram négatif. 2° Ensemencer sur EMB en boîte de Pétri, selon la technique habituelle, pour avoir des colonies isolées. Mettre à l'étuve à 37°.	
24 heures.....	4° A partir de trois ou quatre colonies, faire des colorations : au Gram ; au bleu de méthylène à chaud. 6° Repiquer plusieurs colonies vérifiées sur gélose inclinée.	3° Noter l'aspect et l'odeur des colonies sur EMB. 5° Noter morphologie et coloration des germes. — Noter la présence de capsule éventuellement.
48 heures.....	8° Examen microscopique des colonies. 10° Ensemencer à partir de la gélose : — milieu de Ferguson ; — milieux de Hajna, Clark, O'Meara, Simmons ; — Eau peptonée. 11° Rechercher les agglutinations avec sérums agglutinants pour Salmonelles le cas échéant.	7° Aspect des colonies sur gélose. 9° Mobilité, morphologie, coloration du germe.
52 ^e heure.....		12° Noter les agglutinations éventuelles.
72 ^e heure.....	15° Remettre le tube de Hajna à l'étuve (seulement dans le cas où le lactose n'a pas été attaqué).	13° Noter le test de l'uréase. 14° Noter l'action sur le glucose et le lactose, gaz — production d'hydrogène sulfureux ; — utilisation des citrates.
96 ^e heure.....		16° Noter formation d'indol. Test au rouge de méthyle. Réaction de Voges Proskauer.
8 ^{me} jour.....		17° Noter action définitive sur le lactose.

VALEUR DES CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS

Toutes ces épreuves nous ont permis de faire de nombreuses constatations pratiques sur la valeur des caractères différentiels en ce qui concerne les bacilles Gram négatif habituellement rencontrés dans les infections de l'appareil urinaire.

Retenons tout d'abord qu'il est impossible de faire un diagnostic d'après *la morphologie*.

1° *La fermentation du lactose :*

— quand elle est positive est une preuve certaine qu'il s'agit d'un bacille du groupe des coliformes ;

— si elle est négative, le doute subsiste ; il peut s'agir d'un germe à lactose négatif (Protéus, Salmonelle, Pseudomonas) ou bien d'un Paracoli.

2° *La formation d'indol en eau peptonée :*

elle ne peut pas être considérée comme un test suffisant de la présence de colibacilles. En effet, des Protéus donnent de l'indol, des Paracoli également ; nous avons trouvé des Pyocyaniques indologènes. Et, d'autre part, quelques E. coli vrais (1 sur 10) ne donnent pas d'indol ; tandis que des coliformes ne donnent jamais d'indol.

Donc, la caractérisation d'un bacille de l'urine par son pouvoir indologène donne une double cause d'erreur :

- a) certains bacilles indologènes ne sont pas des Colibacilles, ni même des Coliformes ;
- b) quelques B. Coli ne donnent pas d'indol.

3° *L'uréase* n'est pas caractéristique du *Protéus* : nous l'avons trouvé 31 fois sur 36 *Aérobacters*. On ne doit donc pas dire bacille Gram négatif en présence d'une uréase = *Protéus*.

4° La présence de capsule est constante chez *Aérobacter*. Il suffit pour la mettre en évidence de faire pousser le germe sur milieu EMB et de faire ensuite une coloration au bleu de méthylène à chaud. On voit

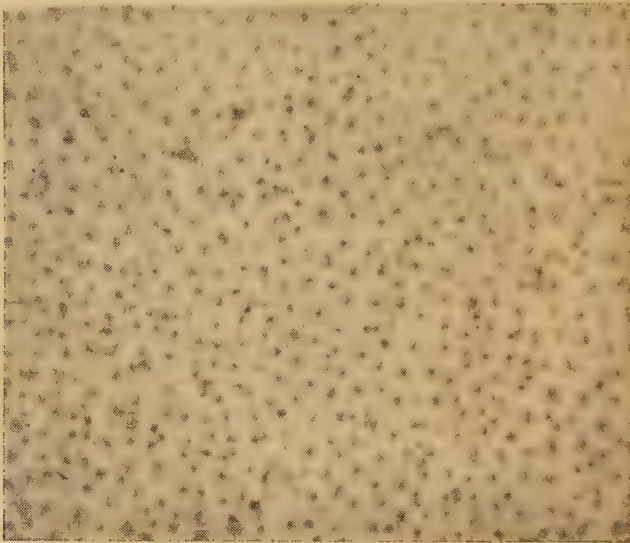


FIG. 3 : Capsules épaisses d'*Aérobacter*.
Coloration simple au bleu de méthylène

le bacille entouré d'une épaisse capsule. Ce serait en somme l'image vue au microscope de la sécrétion muqueuse qui se marque macroscopiquement par le caractère mucoïde et visqueux des colonies sur EMB.

5° Le test au rouge de méthyle et la réaction de Voges-Proskauer ont pratiquement la même valeur ; ils sont toujours couplés : quand l'un est positif, l'au-

tre est négatif et réciproquement dans notre expérience. D'ailleurs, ces deux tests ne sont que la traduction d'un même phénomène :

En effet, au cours de la fermentation du glucose les réactions sont les suivantes :

1° $C^6H^{12}O^6 \rightarrow 2 CH^3 CO COOH$ (acide pyruvique). Réaction commune à *Aérobacter* et *E. coli*.

2° $2 CH^3 CO COOH \rightarrow CH^3 CO CHOH CH^3$ (acétylméthylcarbinol). Réaction propre à l'*Aérobacter*. Dans cette réaction, deux molécules d'acide sont transformées en une molécule neutre, par conséquent le *pH* du milieu sera moins bas après la deuxième réaction qu'après la première.

Donc, en même temps que la réaction de VP est positive, le rouge de méthyle doit virer au jaune, c'est-à-dire que le test est négatif.

Il nous semble que les auteurs qui ont observé des variations différentes ont été abusés par des techniques incertaines.

6° L'aspect des colonies sur EMB est une des caractéristiques les plus constantes du germe. Alors que par repiquages successifs une souche peut perdre quelques-uns de ses caractères, elle garde par contre toujours le même aspect sur EMB.

Pour la différenciation des espèces à l'intérieur même du genre des Coliformes, la culture sur EMB rend compte des formes intermédiaires : en effet, d'une manière générale, les Coliformes ayant des caractères biochimiques intermédiaires entre *Escherichia Coli* et *Aérobacter* donnent des colonies ayant également un caractère intermédiaire. On aurait pu penser *a priori* qu'il s'agissait de colonies impures, mais, après six purifications successives, nous avons obtenu encore ce même aspect intermédiaire.

7° En ce qui concerne l'aspect particulier des colonies de colibacilles hémolytiques sur milieu EMB, nous adoptons — réserve faite du petit nombre de nos cas, soit 42 souches d'E. coli — les conclusions de LOWING ; les colibacilles hémolytiques (pouvoir hémolytique vérifié par ailleurs sur gélose au sang de lapin) donnent sur EMB des colonies petites en gouttelettes, tandis que les E. coli non hémolytiques donnent des colonies ayant l'aspect plus classique décrit par LÉVINE.

FRÉQUENCE DES CARACTÈRES

Au point de vue statistique, voici la valeur des caractères différentiels, avec le taux des réactions positives :

— *Fermentation du lactose* :

en vingt-quatre heures : 100 % des E. Coli et
Aérobacter ;

en soixante-douze heures : 70 % des Paracoli ;

— 0 % des Protéus, Pyocyanique, Salmonelles.

— *Production d'indol* :

89 % des Coli ;

80 % des Paracoli ;

70 % des Protéus ;

25 % des Pyocyaniques ;

5 % des Aérobacter ;

0 % des Salmonelles.

— *Uréase* :

98 % des Protéus ;

95 % des Aérobacter ;

30 % des Paracoli.

— *V P + R M* — :

90 % des Aérobacter ;

90 % des Pyocyaniques.

Tous les autres germes sont R M + V P —.

— *Utilisation des citrates* :

100 % des Aérobacter, Protéus, Paracoli ;

0 % des E. Coli.

RÉSULTATS

Les diverses statistiques publiées en France et à l'étranger donnent des résultats extrêmement variables, tant en ce qui concerne les germes en cause dans les infections qu'en ce qui concerne leur fréquence respective.

SANDHOLZER (*J. of Bactériology*, 1936) publie une statistique indiquant : 83 % d'E. Coli, 13 % d'Aérobacter, 4 % de Protéus, Pyocyanique et des germes divers.

CLARK et LUBS indiquent 40 % d'E. Coli et 40 % d'Aérobacter.

RAFIN ne trouve Aérobacter que dans 1 % des cas.

L. BRUHL trouve 7 % de Pneumobacilles de Friedlander. Des auteurs français et étrangers l'incriminent à l'origine des infections urinaires avec une fréquence allant de 0 à 40 %, mais il s'agit là d'approximations, et nous n'avons pas trouvé dans la littérature française de statistique complète relative aux bacilles Gram négatif des urines pathologiques.

Enfin, qu'il nous soit permis de noter que, de la lecture des articles de cliniciens, il ressort que, pour la forte majorité d'entre eux, infection urinaire à bacilles Gram négatif = Colibacillose.

L'étude de 128 souches nous donne les résultats suivants :

	Aspect dur E M B	Capsule	Glucose	Lactose	SH ₂	Uréase	Indol	R. M.	V. P.	Citrates	Nombre de souches	Pourcentage
Escherichia Coli.....		-	+	+	-	-	+	+	-	-	42	33 o/o
E. coli type II.....		-	+	+	-	-	-	-	-	-		
Aérobacter aérogènes.....		-	-	-	-	+	-	-	-	+		
Aérob. cloacæ.....		-	+	+	-	+	+	-	+	+	36	28 o/o
Proteus.....		-	+	+	-	+	+	+	-	+	28	22 o/o
Paracoli à tend. Protéus.....		-	+	-	+	-	+	-	-	+		
— à tend. Salmonelle.....		-	+	+	+	+	+	+	-	-	14	11 o/o
Salmonelles.....		-	+	-	-	-	+	+	-	-		
Pseudomonas.....		-	+	-	-	-	-	+	-	ou +		
Divers : Fecalis alcaligenes.....		-	-	-	+	-	-	-	+	+	6	4 o/o
Achromobacterium typhiflavum.		-	+	-	-	-	+	+	-	+	2	2 o/o

Nous ne mentionnons pas dans notre statistique le *Pneumobacille* de Friedlander. Nous pensons en effet que l'on peut confondre ce germe avec *Aérobacter* aéro-gènes.

Théoriquement, les deux germes seraient caractérisés par les propriétés suivantes (WILSON et MILES) :

	<i>Aerobacter</i>	<i>Pneumobacille</i> de F.
Indol	—	— ou +
RM.....	—	— ou +
VP.....	+	— ou +
Citrates.....	+	+
SH ²	—	—
Amidon	+	+ ou —
Dextrine.....	+	+ ou —
Inositol	+	+ ou —
Uréase.....	+	+ ou —
Mobilité.....	—	—
Pouvoir pathogène pour la souris.....	—	+

De très nombreux caractères sont décrits, mais ils sont tous inconstants. WILSON et MILES donnent tous ces caractères avec en marge : « le plus souvent ». Il est évident qu'on pourrait proposer encore de nombreux caractères différentiels; mais leur valeur pratique et réelle paraît douteuse.

En pratique, il n'existe aucun caractère permettant de dire si l'on se trouve en présence d'un *Pneumobacille* de Friedlander ou d'un *Aérobacter* :

- les caractères biochimiques sont les mêmes :
Lactose +, Indol —, SH² —, Uréase +,
RM —, VP +, Citrates +
- Même pouvoir pathogène pour la souris : nous
avons inoculé 10 souches d'Aérobacter à des
souris. Celles-ci sont toutes mortes dans les
quarante-huit heures de septicémie à Aéro-
bacter.
- Même aspect sur EMB.
- Présence de capsule chez les deux germes.³
- Les caractères antigéniques (KAUFMANN, 1949) ne
permettent pas non plus de trancher la ques-
tion.

Nous pensons qu'il n'y a entre Aéro-bacter et le Pneu-mobacille de Friedlander qu'une différence de terminologie, et les deux germes devraient être confondus. Ainsi s'expliquerait pourquoi de nombreux auteurs l'ont fréquemment trouvé dans les pyuries, appelant Pneumo-bacille le germe qu'avec les mêmes caractères ils appellent coliforme dans les selles.

En ce qui concerne la place distincte des Paracoli, nous pensons qu'elle doit être maintenue en raison des caractères très particuliers du groupe :

les seuls caractères communs avec les Colibacilles sont la production d'indol en eau peptonée ; la fermentation du lactose est tardive ou inconstante.

Tous les autres caractères les séparent des Coliformes, alors qu'ils les rapprochent soit des Protéus, soit, plus souvent, des Salmonelles. Nous verrons d'ailleurs au chapitre suivant les caractères particuliers des infections à Paracoli, infections toujours graves et résistant à la thérapeutique anticolibacillaire habituelle, évoluant souvent avec une symptomatologie typhoïdique.

Notons enfin qu'il ressort de cette statistique qu'Aérobacter joue un rôle de premier plan dans l'étiologie des affections des voies urinaires, alors que la plupart des auteurs français le décrivent comme non pathogène, ou très peu pathogène : nous le trouvons en cause dans 28 % des cas alors qu'E. Coli l'est dans 33 %.

SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Nous avons été conduit au cours de cette étude à rechercher la sensibilité des diverses souches isolées vis-à-vis de quatre antibiotiques : Pénicilline, Streptomycine, Chloromycétine et Auréomycine.

Bien que portant sur un petit nombre de souches, les mesures de sensibilité ont donné des résultats assez constants pour les diverses souches d'une même espèce, et c'est pourquoi nous les donnons ici.

Nous avons ainsi étudié, selon les techniques classiques :

huit souches d'*Escherichia Coli*.

huit souches d'*Aérobacter*.

quatre souches de *Protéus*.

quatre souches de *Paracoli*.

Les tableaux donnent une moyenne de la sensibilité des souches.

1° **PÉNICILLINE** (1) : comme on pouvait le prévoir, aucun de ces germes n'est sensible à la Pénicilline.

	50 U. p. cc.	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039
E Coli....	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aerobacter	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteus....	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Paracoli...	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(1) + : le germe pousse.

— : le germe ne pousse pas.

Le petit nombre de souches étudiées ne nous autorise pas à tirer des conclusions formelles de cette étude.

Notons néanmoins :

- 1° La sensibilité absolument différente d'E. Coli et d'Aérobacter vis-à-vis de la Streptomycine, de la Chloromycétine et de l'Auréomycine.
 - 2° Dans le groupe des Paracoli, une sensibilité élective à la Streptomycine ou à la Chloromycétine selon qu'il s'agit de Paracoli à tendance Protéus ou à tendance Salmonella.
 - 3° La sensibilité des Aérobacter à l'Auréomycine : jusqu'à 0 γ 097 par centimètre cube pour les huit souches, tandis qu'à cette concentration aucun autre germe n'est inhibé par aucun antibiotique.
-

QUELQUES OBSERVATIONS

d'infections urinaires à bacilles Gram négatif

La statistique que nous donnons plus haut tend à montrer que *E. Coli* est loin d'être le seul bacille en cause dans les infections urinaires. On voit qu'*Aérobacter*, *Protéus* et les *Paracoli* prennent une bonne part dans leur étiologie. La nature du germe est un élément important du pronostic et confère un aspect particulier au tableau clinique. Cependant tous ces germes peuvent se localiser à tous les étages de l'appareil urinaire et donner ainsi toutes les infections.

Nous avons relevé, dans le service de M. le professeur TRUC, quelques observations de malades atteints d'infections à colibacilles *Aérobacter*, *Protéus* et *Paracoli*.

Notons tout d'abord que les malades atteints d'une affection urinaire à colibacille sont peu souvent hospitalisés ; il s'agit en général de consultants, qui bénéficient d'un traitement ambulatoire.

L'observation banale de l'infection urinaire à *E. Coli* est, en général, assez peu différente de celle-ci :

Observation n° 1 :

Mme B..., 38 ans. — Pyurie intermittente avec douleurs lombaires, troubles digestifs, état subfébrile. On note dans ses antécédents une constipation habituelle, entrecoupée d'épisodes diarrhéiques.

Le pyélogramme est normal.

L'examen cyto-bactériologique pratiqué à plusieurs reprises montre : « présence de pus et de *E. Coli* ».

Un traitement hygiéno-diététique et une thérapeutique sulfamidée entraînent rapidement une amélioration importante, les urines redevenant claires et aseptiques.

Dans la plupart des observations, on trouve dans les antécédents des troubles digestifs ; l'affection prend rarement un caractère sévère et cède assez rapidement à une thérapeutique appropriée : sulfamides - Streptomycine.

Par contre, dès qu'il s'agit d'Aérobacter, on ne note pas de troubles digestifs antérieurs ; l'affection prend une allure aiguë d'emblée. Il s'agit en général de pyélonéphrite aboutissant rapidement à la pyonéphrose.

Observation n° 2 :

M. Hant... A., 42 ans. — Pyélonéphrite avec pyurie abondante et signes de cystite. La fièvre est élevée, l'état général atteint. Le traitement Pénicilline, Sulfamide, Streptomycine est inefficace. Rapidement l'évolution se fait vers la pyonéphrose, qui nécessite une néphrectomie.

Examens des urines : « présence de pus et d'Aérobacter ». Mêmes résultats au cours d'examens répétés.

Observation n° 3 :

M. Terr..., 72 ans. — Pyélonéphrite droite apparaissant après une adénomectomie, avec poussées fébriles à 39-40°.

Examen : « pus, Aérobacter ». Les examens pratiqués montrent qu'il s'agit d'une uretéropyélonéphrose congénitale sur laquelle vient se greffer une infection probablement d'origine aéroène.

Le traitement Sulfamide - Pénicilline, Streptomycine est inefficace. Néphrectomie.

Observation n° 4 :

M^{lle} Gui..., 17 ans. — Lithiase urinaire d'immobilisation chez une malade traitée, à Berck, pour coxalgie.

Suppuration péri-néphrétique résistant au traitement par la Pénicilline et la Streptomycine.

Examen des urines : « pus, présence d'Aérobacter ».

Observation n° 5 :

M. Mo... Honoré. — Tuberculose rénale bilatérale avec lithiase infectée.

Examen des urines : « pus, présence d'Aérobacter aérogènes ».

D'une manière générale, les affections à *Aérobacter* sont marquées par une pyurie abondante et persistante, sans rémission, et, du point de vue anatomo-clinique, par une tendance à la nécrose du parenchyme rénal, aboutissant à la pyonéphrose ; ce sont souvent des surinfections se greffant sur des tuberculoses rénales ou sur des malformations congénitales, ou sur des adénomes prostatiques.

Elles exigent la mise en œuvre immédiate d'une thérapeutique appropriée, sans perdre de temps, à essayer les Sulfamides, la Pénicilline et même la Streptomycine qui sont inefficaces.

Les essais de sensibilité à la Chloromycétine indiquent par contre que cet antibiotique serait particulièrement indiqué dans les affections à *Aérobacter*.

En ce qui concerne les *Protéus*, nous les avons trouvés, sept fois sur dix, chez des malades atteints de tuberculose rénale et chez qui une suppuration persistait malgré la néphrectomie.

Observation n° 6 :

M. G..., 61 ans. — Bacillose urogénitale opérée par néphrectomie. Examen des urines après l'intervention :

« quelques leucocytes altérés, *Protéus* ».

Observation n° 7 :

M. And... — Pyurie chez un malade atteint de bacillose rénale confirmée bactériologiquement. Tous les examens pratiqués ont montré à chaque fois : « pus, présence de *Protéus vulgaris* ».

Observation n° 8 :

M. Seij..., 38 ans. — Tuberculose rénale droite traitée par néphrectomie. Il persiste une pyurie importante et des examens répétés ont montré régulièrement : « pus, présence de *Protéus vulgaris* ».

Protéus vulgaris pourrait donc avoir la même signification que le *Pyocyanique*, et sa présence dans des urines purulentes doit faire soupçonner une étiologie tuberculeuse.

Observation n° 9 :

M. Lu..., 63 ans. — Pyélonéphrite, avec pyurie, polakiurie, fièvre élevée. Les antiseptiques banaux, les Sulfamides, la Pénicilline et la Streptomycine sont inefficaces.

Examen bactériologique des urines : « pus, présence de paracolibacilles ».

Observation n° 10 :

M. Bon... — Néphrectomie après un traumatisme. Fistulisation d'un abcès sous-phrénique, avec pus abondant. L'infection résiste à la Tyrothricine, à la Streptomycine locale et générale.

Examen : « pus, présence de Paracolibacille ».

CONCLUSIONS

L'étude de 125 souches de bacilles à Gram négatif aérobies isolés d'urines pathologiques nous a montré :

1° Que les germes en cause sont variés et nombreux, et si l'on adopte une méthode d'identification rigoureuse on s'aperçoit que le colibacille vrai, c'est-à-dire *Escherichia Coli*, n'est pas aussi fréquemment en cause qu'il n'est classique de le dire.

2° Que l'on peut conclure à l'identité bactériologique entre *Aérobacter* et *Klebsiella pneumoniae*.

3° Qu'une division du groupe complexe des Para Colons en deux sous-groupes :

l'un à tendance *Protéus*,

l'autre à tendance *Salmonella*,

pourrait rendre compte des caractères biochimiques particuliers de ces germes, tout en expliquant certains caractères cliniques des infections urinaires à Para Colons.

Des observations montrant l'évolution extrêmement grave des affections urinaires à *Aérobacter* et à *Paracoli* indiquent la nécessité de l'identification précise et rapide du germe en cause pour que soit mise à profit sa sensibilité très particulière à l'Auréomycine ou à la Chloromycétine.

L'identification par la méthode classique nécessite une longue série de recherches dont la mise en train est difficilement compatible avec les nécessités de la pratique quotidienne.

Or, la longue et minutieuse recherche des caractères différentiels nous a toujours confirmé le diagnostic porté d'après le simple aspect des colonies sur EMB ; aussi tenons-nous la culture sur milieu EMB comme le temps essentiel de l'identification des bacilles à Gram négatif de l'urine.

Nous proposons donc la culture systématique sur milieu Eosine-Bleu de méthylène qui permet une identification certaine, rapide et facile des germes rencontrés dans les pyuries, et permet de les classer en quatre grands groupes :

Escherichia.
Aérobacter.
Protéus.
Paracoli.

BIBLIOGRAPHIE

- BOIVIN et CORRE. — Colibacilles saprophytes et pathogènes. *La Presse médicale*, 1943, n° 21.
- BRISOU. — Entérobactéries pathogènes.
- Mlle CORRE. — *Thèse*, Paris, 1943.
- BURKE GAFFNEY HJ O'D. — « The type of Coliform bacilli prevalent in urine and their significance with special reference to the sanitary aspects ». *J. of Hygiene*, 1933, t. 33.
- CLARK et LUBS. — *J. of Infect. diseases*, 1915, t. 17.
- Congrès International des microbiologistes de langue française, Paris, 1938.
- DUDGEON L. S. — Acute and chronic infections of the urinary tract due to the bact. coli. *The Lancet*, 1908.
- DUDGEON L. S. — Wordley T., Bantree E. : on B. Coli infections of the urinary tract especially in relation to hemolytic organisms. *J. of Hyg.*, 1922, t. 21.
- FALTIN. — *Annales des maladies des organes génito-urinaires*, 1902.
- FISCH. — Variation de la morphologie des B. Coli. *Journal d'urologie*, 1926.
- HEITZ-BOYER. — Néphrites et pyélonéphrites d'origine intestinale. *Soc. Méd. des Hôp.*, 1919, 25,7.
- HEITZ-BOYER. — Syndrome entéro-rénal. *Journal médical français*, 1923, p. 178.
- SEIDMANN et STADNICHENKO. — A study of 200 cultures of Gram negative bacilli isolated from cases of genito-urinary infections. *J. Bact.* 1929, 67.
- KAUFFMANN. — Serology of Klebsiella. *Acta path. et Microb. Scandinavia*, 1949, 26.
- LEVINE. — *J. of Bact.* 1916, I, 27 ; 1916, I., 153. — *J. of infections diseases*, 1916, 18, 358. — *Amer J. of. Public Health*, 1917, 7, 784. — *J. of Bact.*, 1918, 3. — *A. J.P.H.*, 1921, 11. — *A.J.P.H.*, 1941, 31.
- LEVINE et EPSTEIN. — *A.J.P.*, 1934, 24, 505.
- MILLARES. — *Thèse médecine*, 1939, Buenos-Aires.

- PASTEAU. — Infections vésicales à Coli d'origine externe. *Association française d'urologie*, 1926.
- Public Health Reports*, 1948, 63, 9.
- SANDHOLZER L. A. — Cultural characteristics of aerobic Gram negative bacilli isolated from genito-urinary infections. *J. of. Bact.*, 1936, 31.
- STADNICHENKO ELLIS SEEDENA. — *Bull. of. John Hopkins Hôp.*, octobre 1928.
- VOGES O. PROSKAUER B. — Beiträge zur differential diagnose der Bakterien der hemmorrhagischen Septicämien. *Zeitschrift für Hygiene*, 1898, 28.
- WALKER LOWING. — *J. Bact.*, 1945, 50.
- WILSON W.J. — Bacteriological observation on colon bacilli infecting the urinary tract with special remarks on certain colon bacilli of the anaerogenous class. *J. of. Hygiene*, 1908, 8, 543-552.
- HENRIKSEN S.D. — Taxonomy and classification of the genus Klebsiella. *Acta path. Microb. Scand.*, 1949, 26, 435-446.
- POOL T.L. et COOK E.N. — Present concepts of treatment of infections of urinary tract. *J. Am. Méd.*, 1947, 133, 584-587.
- LAZARUS J.A. et SCHWARTZ L.H. — Importance of precise bacteriological data in treatment of infection of urogenital tract.
- HEWITT. — Treatment of urinary tract infections with streptomycin. *Ann. Journ.*, 1947, 2, 474-484.
-

SERMENT

En présence des maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Etre Suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je reste fidèle à mes promesses, que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.
